

14.01.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 05 MAR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月28日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第288701号

出 願 人

Applicant(s):

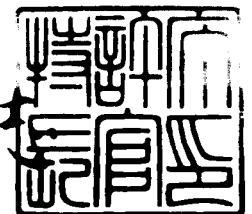
資酒造株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月19日

Commissioner,
Patent Office

山 佐 建 彦



【書類名】 特許願

【整理番号】 1-980916-1

【提出日】 平成10年 9月28日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 A61K 31/11 ADS
A61K 31/66 ADS

【発明の名称】 アポトーシス誘発用物質

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 異 容子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 大野木 宏

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 務 華康

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 猪飼 勝重

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078503

【弁理士】

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

【識別番号】 100087022

【弁理士】

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

【識別番号】 100089428

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705578

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘発用物質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記（a）、（b）、（c）、（d）より選択される少なくとも1種の化合物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアポトーシス誘発用物質の製造方法。

（a）ペントース、

（b）ペントース誘導体、

（c）ペントースを含有する化合物、

（d）ペントース誘導体を含有する化合物。

【請求項2】 ペントース誘導体がデオキシペントースである請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項3】 ペントースがリボースである請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項4】 ペントース誘導体がデオキシリボースである請求項1又は2記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項5】 ペントースを含有する化合物がリボヌクレオシド、リボヌクレオチド又はリボ核酸である請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項6】 ペントース誘導体を含有する化合物がデオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸である請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項7】 下記（a）、（b）、（c）、（d）より選択される少なくとも1種の化合物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質。

（a）ペントース、

（b）ペントース誘導体、

(c) ペントースを含有する化合物、

(d) ペントース誘導体を含有する化合物。

【請求項8】 ペントース誘導体がデオキシペントースである請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項9】 ペントースがリボースである請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項10】 ペントース誘導体がデオキシリボースである請求項7又は8記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項11】 ペントースを含有する化合物がリボヌクレオシド、リボヌクレオチド又はリボ核酸である請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項12】 ペントース誘導体を含有する化合物がデオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸である請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項13】 アポトーシス誘発用物質が、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン、又は1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オンである請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項14】 アポトーシス誘発活性を有する、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-

化合物を有効成分として含有することを特徴とする4, 5-ジヒドロキシー-2-ペ

ロベンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物に感受性を示す疾病治療用医薬又は予防用医薬。

【請求項 15】 医薬が制がん剤である請求項 14 記載の医薬。

【請求項 16】 医薬がアポトーシス誘発剤である請求項 14 記載の医薬。

【請求項 17】 医薬が抗リウマチ剤である請求項 14 記載の医薬。

【請求項 18】 医薬がヒトインスリン様増殖因子産生誘導剤である請求項 14 記載の医薬。

【請求項 19】 医薬が熱ショックタンパク誘導剤である請求項 14 記載の医薬。

【請求項 20】 アポトーシス誘発活性を有する4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び／又は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料。

【請求項 21】 制がん用、アポトーシス誘発用、抗リウマチ用、ヒトインスリン様増殖因子産生誘導用又は熱ショックタンパク誘導用である請求項 20 記載の食品又は飲料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、その製造方法、及び該アポトーシス誘発用物質の医薬、飲食品としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死である。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化されることによりプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、またある場合には不活性型として細胞内に存在するプログラム死タンパクが活性化される。こうして生成した活性型プログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、及びその製造方法を提供し、更には該アポトーシス誘発用物質を有効成分とする医薬、飲食品を提供することにある。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は下記（a）、（b）、（c）、（d）より選択される少なくとも1種の化合物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアポトーシス誘発用物質の製造方法に関する。

(a) ペントース、

(d) ペントース誘導体を含む化合物

• 2008年12月1日，中国铝业公司正式挂牌成立，成为我国第一家超大型中央企业。

[illegible]

酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質に関する。

- (a) ペントース、
- (b) ペントース誘導体、
- (c) ペントースを含有する化合物、
- (d) ペントース誘導体を含有する化合物。

本発明の第3の発明はアポトーシス誘発活性を有する、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物に感受性を示す疾病治療用医薬又は予防用医薬に関する。

本発明の第4の発明はアポトーシス誘発活性を有する4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び／又は1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料に関する。

【0005】

本発明者らは(a) ペントース、(b) デオキシリボース等のペントース誘導体、(c) リボヌクレオシド、リボヌクレオチド、リボ核酸等の、ペントースを

含有する化合物、(d)デオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸等の、ペントース誘導体を含有する化合物、から選択される少なくとも1種の化合物の加熱により得られる加熱処理物が、がん細胞に強いアポトーシス誘発作用を有することを見出し、該加熱処理物中の活性成分の単離にも成功し本発明を完成した。以下、アポトーシス誘発作用を有する該加熱処理物を単に本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物と称す。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

ペントースは炭素を5個持つ糖の総称であり、アルドペントースとしてはアラビノース、キシロース、リボース、リキソース等が、ケトペントースとしてはリブロース、キシルロース等が天然に存在する。

ペントース誘導体としては、例えばデオキシペントース、ペンチトールが挙げられ、前者ではデオキシリボース、後者ではリビトール、アラビトール、キシリトールが天然に存在する。また、炭素数5のアミノ糖、アルドン酸、アルダル酸等もペントース誘導体であり、合成法等によって得られる。

ペントースを含有する化合物の例としてはペントースリン酸、リボヌクレオシド、リボヌクレオチド等の低分子化合物、リボ核酸、アラビナン、キシラン等の高分子化合物が挙げられる。また、ペントースのエステル、エーテル、配糖体、これらの塩等もペントースを含有する化合物であり、合成法等によって得られる。

ペントース誘導体を含有する化合物の例としては、デオキシペントースを含有するデオキシペントースリン酸、デオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、ペンチトールを含有するリボフラビン、リビトール

配糖体、エーテル、エステル、アミド、アミン、アルコール、有機酸、有機塩等からなる化合物等によって得られる。

【0007】

本発明は、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、から選択される少なくとも1種の化合物の加熱により得られる加熱処理物を、がん細胞に強いアポトーシス誘発作用を有することを見出し、該加熱処理物中の活性成分の単離にも成功し本発明を完成した。以下、アポトーシス誘発作用を有する該加熱処理物を単に本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物と称す。

化合物、ペントース誘導体を含有する化合物の種類は加熱処理によってアポトーシス誘発用物質が生成するものであれば何ら限定はない。また、ペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物は動植物の細胞から抽出する、発酵法で製造する、化学的に合成する等の方法で得られるが、これらがいかなる方法で製造されていても加熱処理によってアポトーシス誘発用物質が生成する限り本発明で使用可能である。

本発明ではペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物及び／又はペントース誘導体を含有する化合物の含有物も使用できる。様々なペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物が動植物の組織、動植物の細胞には含有されているので、これらをそのまま本発明で使用することもできる。なお本発明においてはペントース及び／又はペントース誘導体を含有する化合物からはウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物が除かれる。ウロン酸誘導体とはウロン酸のラクトン、ウロン酸のエステル、ウロン酸のアミド、ウロン酸の塩等である。

【0008】

本発明のアポトーシス誘発用物質の製造における加熱処理方法としては、アポトーシス誘発作用を有する加熱処理物が得られる条件であれば特に限定はないが、上記(a)～(d)から選択される少なくとも1種の化合物(但しウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く)を、例えば30～400℃で数秒～数日、好ましくは50～200℃で数秒～24時間加熱処理を行うことにより、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を得ることができる。加熱処理物中には複数のアポトーシス誘発作用を示す物質が生成されており、目的に応じて、pH、時間、温度、原料濃度等の加熱処理条件を変えることにより、希望する物質を有する本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を調製することができる。

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理によりアポトーシス誘発用物質が得られる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾式加熱でも良い。湿式加熱としては、水蒸気加熱、水蒸気加圧加熱、加圧式加熱等任意の湿式加熱方法を用いる

ことができる。乾式加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。また本発明のアポトーシス誘発用物質の原料は通常の、煮る、焼く、炒る、煎じる、蒸す、炒める、揚げる等の任意の加熱方法で処理することができる。

本発明のアポトーシス誘発用物質はアポトーシス誘発作用を指標に精製処理を行っても良い。精製手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良い。

なお、これらの精製手段により精製された精製物及び部分精製物も本発明のアポトーシス誘発用物質に包含される。

【0009】

本発明者らは本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物中に、バイオケミストリー (Biochemistry)、第35巻、第659～665頁(1996)に記載のトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、及びこれらの類縁体が含有されていることを見出し、これらの化合物が制がん作用、アポトーシス誘発作用等を示すことを見出した。

更に本発明の加熱処理物質中より4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン、1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オンを単離することに成功し、これらの化合物ががん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性等の生理活性を有することを見出した。

したがって、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2

, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-

ジオキサラン、1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オン、及びこれらの類縁体

を選択して、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性等の生理活性を有することを見出した。

ージヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び/又は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンに感受性を示す疾患、例えばがん性疾患、アポトーシス誘発抑制に起因する疾患等の治療用医薬又は予防用医薬を提供することができる。

【0010】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればアポトーシス誘発剤を製造することができる。すなわち一般的には、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【0011】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペ

ンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

【0012】

ニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

ロキシー 3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0013】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人 1 日当り 1~1000mg、好ましくは 10~200mg である。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0014】

4, 5-ジヒドロキシー 2-ペンテナール、4-ヒドロキシー 2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー 1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び 1, 5-エポキシ 1-ヒドロキシー 3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有するアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人 1 日当り 0.01~50mg、好ましくは 0.1~10mg である。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0015】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、4，5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3，4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1，3-ジオキサラン及び1，5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンはがん細胞にアポトーシス誘発作用、細胞増殖抑制作用、トポイソメラーゼII阻害作用等を有し、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4，5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3，4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1，3-ジオキサラン及び1，5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として制がん剤を製造することができる。すなわち、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4，5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3，4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1，3-ジオキサラン及び1，5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。

【 0 0 1 6 】

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっ

トリス誘発剤に準じ使用すれば良い。

[illegible]

静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0017】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を有効成分とする制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用物質の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0018】

4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシー-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシー-1-ヒドロキシー-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0019】

リウマチは骨膜細胞や軟骨細胞に障害が起こる自己免疫疾患である。本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン

－1－オン、2－（3，4－ジヒドロキシ－1－ブテニル）－4－（2－ホルミルビニル）－1，3－ジオキサラン及び1，5－エポキシ－1－ヒドロキシ－3－ペンテン－2－オンから選択される少なくとも1以上の化合物は、滑膜細胞へのアポトーシス誘発作用を有する。したがって、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4，5－ジヒドロキシ－2－ペンテナール、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン、4－（9－アデニル）－2－シクロペンテン－1－オン、4－（9－グアニル）－2－シクロペンテン－1－オン、2－（3，4－ジヒドロキシ－1－ブテニル）－4－（2－ホルミルビニル）－1，3－ジオキサラン及び1，5－エポキシ－1－ヒドロキシ－3－ペンテン－2－オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として抗リウマチ剤を製造することができる。すなわち、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4，5－ジヒドロキシ－2－ペンテナール、4－ヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン、4－（9－アデニル）－2－シクロペンテン－1－オン、4－（9－グアニル）－2－シクロペンテン－1－オン、2－（3，4－ジヒドロキシ－1－ブテニル）－4－（2－ホルミルビニル）－1，3－ジオキサラン及び1，5－エポキシ－1－ヒドロキシ－3－ペンテン－2－オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗リウマチ剤を製造することができる。抗リウマチ剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。

【0020】

抗リウマチ剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

本発明は、長短はなしに、経口剤、注射剤、点滴用剤等の非経口剤、外用剤（例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を有効成分とする抗リウマチ剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物の量が成人1日当たり1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0022】

4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する抗リウマチ剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0023】

ヒトインスリン用増殖因子（以下、hIGF-1と称す）は種々の細胞に多彩な生理作用を有し、II型糖尿病（インスリン非依存性）と成長障害疾患（小人症）への治療薬として使用されている。本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジ

ヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンはh I G F-1 産生誘導作用を有する。従って、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分としてh I G F-1 産生誘導剤を製造することができる。すなわち、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソラン及び1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればh I G F-1 産生誘導剤を製造することができる。h I G F-1 産生誘導剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。h I G F-1 産生誘導剤はh I G F-1 産生誘導を要する疾患、II型糖尿病の治療薬、予防薬、小人症の治療薬等として使用することができる。

【 0 0 2 4 】

h I G F - 1 産生誘導剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポ

(3) 治療効果　　(イ) 副作用は、一般に少ない。投与法は経路に拘われない。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、皮下注射液中、無痛性、無刺激性、無毒性、無アレルギー性を有する。

【0025】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を有効成分とする h I G F-1 産生誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物の量が成人 1 日当り 1~1000 mg、好ましくは 10~200 mg である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0026】

4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有する h I G F-1 産生誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人 1 日当り 0.01~50 mg、好ましくは 0.1~10 mg である。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0027】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び 1, 5-エポキシ-1-ヒド

ロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物は熱ショックタンパク誘導作用を有し、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とする熱ショックタンパク誘導剤を製造することができ、熱ショックタンパク誘導を必要とする疾患に応じた方法で投与することができる。

【0028】

すなわち本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物は70 kダルトン(HSP70)等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、これらの化合物はがん免疫にも有効である。更に抗炎症等生体防御作用をも有する。本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル

ルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を摂取する動物は、がん、炎症、免疫不全、アレルギー、風湿疾患等の慢性疾患が予防

、治療できる。

なお熱ショックタンパクは細胞や個体が平常の温度よりも5～10℃程度高い温度変化を急激に受けたときに合成が誘導されるタンパクの総称であり、原核生物から高等真核生物まで幅広く分布している。真核生物の熱ショックタンパクとしてはHSP90、HSP70、ユビキチン、HSP26等が知られている。その中でHSP70は分子シャペロン的一种であり、フォールディングが完了していない、または不完全にフォールディングしたタンパクに結合して立体構造の形成を助ける。熱ショックタンパクのアミノ酸配列は進化の過程でよく保存されており、HSP70は大腸菌のDnaKタンパクと相同である。ヒトには約10個のHSP70遺伝子が存在しているが、これらのあるものは構成的に発現しており、あるものは様々な刺激によって誘導される。熱ショックタンパクの合成は熱ショックのほかに様々な化学物質、酸化ストレス等の細胞障害によっても誘導される。

【0029】

熱ショックタンパク誘導剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

熱ショックタンパク誘導剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0030】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を有効成分とする熱ショックタンパク誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物の量が成人1日当たり1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるい

は範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0031】

4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する熱ショックタンパク誘導剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01~50mg、好ましくは0.1~10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0032】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物をアポトーシス誘発用飲食品、制がん用飲食品、抗リウマチ用飲食品、hIGF-1

【0033】

本発明の薬剤は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01~50mg、好ましくは0.1~10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

ニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル) - 4-(2-ホルミルビニル) - 1, 3-ジオキソラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を含有、希釈及び/又は添加してなる食品又は飲料は、食品又は飲料中に本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル) - 4-(2-ホルミルビニル) - 1, 3-ジオキソラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物の生理作用を発現するための必要量が含有されておれば良い。

本発明の食品又は飲料、例えばアポトーシス誘発用食品又はアポトーシス誘発用飲料、制がん用食品又は制がん用飲料等のそれぞれの製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にアポトーシス誘発作用又は制がん作用等を有する本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル) - 4-(2-ホルミルビニル) - 1, 3-ジオキソラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物の有効量が含有、希釈及び/又は添加されていれれば良い。

【0034】

これらの食品又は飲料としては、アポトーシス誘発作用又は制がん作用を有する本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル) - 2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル) - 4-

2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物の有効量が含有、添加及び/又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

【0035】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンはその生理活性を有する有効量をマウスに投与しても急性毒性は認められず、例えば4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンをそれぞれ100mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。

【0036】

本発明の薬剤は生体の恒常性の維持に有用である。また本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等

食品又は飲料中に本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を含有させることに

本発明の薬剤は生体の恒常性の維持に有用である。また本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン及び1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンから選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等

食品を製造することができる。本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物を含有する食品又は飲料は、該加熱処理物の有する種々の生理活性、すなわちアポトーシス誘発作用、制がん作用、抗リウマチ作用、h I G F-1 産生誘導作用、熱ショックタンパク誘導作用等によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果、抗ウイルス効果等を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持、特に胃腸健康維持に有用な食品又は飲料である。

【0038】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

【0039】

実施例1

1M L (+) -アラビノース (和光純薬社製、010-04582) 水溶液、1M D (-) -アラビノース (和光純薬社製、013-04572) 水溶液、1M D (+) -キシロース (ナカライテスク社製、367-19) 水溶液、D-リボース (ナカライテスク社販売、302-10) 水溶液のpHは順に5.3、4.9、4.4、4.7であった。

これらを121℃で4時間加熱処理し、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に対するアポトーシス誘発活性を次のように測定した。

各々の加熱物及び非加熱物を0.22 μ mのメンブレンフィルターで滅菌し、アポトーシス誘発活性の試料を調製した。これらの試料を滅菌蒸留水で2倍、4倍、8倍、16倍及び32倍希釈してヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞に対する細胞増殖抑制活性を次のように測定し、アポトーシス誘発活性の強さを比較した。

すなわち各希釈液10 μ l又は滅菌蒸留水10 μ lをそれぞれ96穴マイクロタイタープレートのウェルに入れた。そこに5000個のHL-60細胞(ATCC CCL240)を含む10% ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有RPMI 1640培地 (ニッスイ社製) 90 μ lを加え、5% 炭酸ガス存在下37℃

で48時間培養した。光学顕微鏡で細胞の形態を観察した後、5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 μ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態、細胞内に生じるホルマゼン形成を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール100 μ lを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした(MTT法)。

【0040】

その結果、非加熱のL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液及びD-リボース水溶液添加区分においては対照の水添加区分と細胞増殖の違いが認められず、アポトーシス誘発活性が認められなかった。一方、121℃で4時間加熱処理したL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液、D-リボース水溶液の、各々4倍、4倍、8倍、16倍希釈液添加区分において検鏡によって細胞の変形が見られ、590nmにおける吸光度が水添加の対照と比べて減少していたことからがん細胞増殖抑制活性が認められた。

【0041】

実施例2

(1) 1M 2-デオキシ-D-リボース(シグマ社製、D2751)水溶液と0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液のpHはそれぞれ4.7、5.4であった。0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の一部を取り、1N NaOHでpH7.1に調整した。これらを121℃で4時間加熱処理し、HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例1の方法で測定した。なお、希釈倍率は2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍及び128倍とした。

その結果、非加熱の1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液、0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液、0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液をpH7.1に調整した水溶液の、各々2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍及び128倍希釈液添加区分において検鏡によって細胞の変形が見られ、590nmにおける吸光度が水添加の対照と比べて減少していたことからがん細胞増殖抑制活性が認められた。

、16倍、16倍希釈液添加区分において細胞増殖の抑制が認められた。

【0042】

(2) 実施例2-(1)で得た1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の121℃、4時間加熱処理物を以下の逆相HPLCで分離した。

試料注入量：40 μ l

カラム：YMC-Pack ODS-AM (4.6 \times 250 mm、ワイエムシー社製)

移動相A：水

B：80% アセトニトリル水溶液

流速：0.8 ml/分

溶出：移動相A (5分間) → 移動相AからBへの直線濃度勾配 (20分間) → 移動相B (5分間)

検出：215 nmにおける吸光度

2分ごとに分取した各画分を減圧下濃縮し、実施例1の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定した。この結果、画分4 (保持時間6分～8分) に強い活性、画分8 (保持時間14分～16分) に弱い活性が認められた。

【0043】

(3) 実施例2-(2)の逆相HPLCを繰り返して画分4の乾燥物を調製した。本試料の質量分析をDX302 (日本電子社製) を用いて行った。また、本試料を重ジメチルスルホキシドに溶解してJNM-A500 (日本電子社製) を用いて核磁気共鳴スペクトルを測定した。

FAB-MS

m/z 117 [M+H]⁺

但し、マトリックスにグリセロールを用い測定した。

¹H-NMR

δ 3.44(2H, m, 5-H), 4.27(1H, m, 4-H), 4.95(1H, t, 5-OHのH), 5.32(1H, d, J=5.0 Hz, 4-OHのH), 6.20(1H, ddd, J=15.5, 8.0, 2.0 Hz, 2-H), 7.10(1H, dd, J=4.0, 15.5 Hz, 3-H), 9.55(1H, d, J=8.0 Hz, 1-H)

但し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフトを2.49 ppmとして表わした。

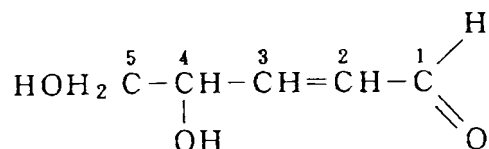
なお、 $^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルの帰属の番号は下記式（化1）の通りである。

この結果、本試料の物性値はトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと一致し、本試料が下記式（化1）で表されるトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールであることが明らかになった。

本試料は強いアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を示した。

【0044】

【化1】



【0045】

実施例3

(1) 4種類の100mM デオキシリボヌクレオチド（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）を121℃で4時間加熱した。各加熱試料のがん細胞増殖抑制活性を実施例1に記載のMTT法で測定した。

この結果、dATP、dGTPの各加熱処理物に関しては、16倍希釈液まで、dCTP、dTTPの各加熱処理物に関しては、8倍希釈液まで添加した培地において、水を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、試料添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の水10μl添加培養細胞においてはこれ

(2) 5種類のデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、デオキシウリジン、デオキシリボース）をそれぞれ100mMに溶解し、121℃で4時間加熱した。各加熱試料のがん細胞増殖抑制活性を実施例1に記載のMTT法で測定した。この結果、各加熱試料の増殖抑制活性は、溶解度か異なるが、

水溶液の濃度はそれぞれ、デオキシアデノシン：25 mM、デオキシグアノシン：25 mM、デオキシシチジン：1 M、デオキシチミジン：0.4 M、デオキシウリジン：1 Mである。

各加熱試料のがん細胞増殖抑制活性を実施例1に記載のMTT法で測定した。この結果、デオキシアデノシン加熱処理液は2倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で1.25 mM）まで、デオキシグアノシン加熱処理液は4倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で0.625 mM）まで、デオキシシチジン加熱処理液は128倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で0.78 mM）まで、デオキシチミジン加熱処理液は16倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で2.5 mM）まで、デオキシウリジン加熱処理液は64倍希釈液（デオキシリボヌクレオシド換算で1.56 mM）まで添加した培地において、水を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、試料添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の水10 μ l 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

【0047】

(3) 実施例3-(2)で調製したそれぞれの加熱溶液を以下の条件でHPLCで分離した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts (5 μ m)、20 mm \times 25 cm

移動相：A 0.1% TFA水溶液

B 0.1% TFA/50% アセトニトリル水溶液

流速：8 ml/分

溶出条件：10分間移動相A 100% \rightarrow 40分かけて移動相A 100%から移動相B 100% \rightarrow 10分間移動相B 100%

検出：215 nmにおける吸光度

実施例3-(2)で調製したそれぞれの加熱溶液1.5 mlをHPLCにかけ、1分毎に分取し、各フラクションを濃縮乾固後水に再溶解して、実施例1記載のMTT法を行ったところ、どの加熱溶液試料においても、15~16分付近のピークと25~28分付近のピークにアポトーシス誘発活性が確認された。

【0048】

(4) 実施例 3-(3) 記載の 15~16 分付近のピークの物質と、実施例 2-(3) で単離、構造解析されたトランス-4, 5-ジヒドロキシ 2-ペンテナールの比較を以下の条件の HPLC で行った。

カラム: TSK gel ODS-80Ts (5 μ m)、4.6 \times 250 mm

移動相: A 0.1% TFA 水溶液

B 0.1% TFA/50% アセトニトリル水溶液

流速: 1 ml/分

溶出条件: 10 分間移動相 A 100% \rightarrow 10 分かけて移動相 A 100% から移動相 B 100% \rightarrow 10 分間移動相 B 100%

検出: 215 nm における吸光度

その結果、15~16 分付近の活性物質の溶出位置はトランス-4, 5-ジヒドロキシ 2-ペンテナールと一致した。

更に、各加熱物の 15~16 分付近の活性物質の核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) による構造解析を行った。その結果、15~16 分付近の活性物質はトランス-4, 5-ジヒドロキシ 2-ペンテナールと同定された。

【0049】

実施例 4

(1) 0.25 mg/ml デオキシリボ核酸 (DNA) ナトリウム塩 (和光純薬社製、047-22491) 水溶液の pH は 8.9 であった。この一部を取り、1N HCl で pH 7.3 に調整した。これらを 121 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間加熱処理し、HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制活性を実施例 1 の方法で測定した。なお、希釈倍率は 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍及び 32 倍とした。

その結果、121 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間加熱処理した DNA ナトリウム塩水溶液 (pH 未

調整) と、pH 7.3 に調整した DNA ナトリウム塩水溶液とを比較すると、pH 7.3 に調整した DNA ナトリウム塩水溶液の方が、細胞増殖抑制活性が認められた。

【0050】

(2) 0.25 mg/ml デオキシリボ核酸 (DNA) ナトリウム塩水溶液を、121 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間加熱処理

理した加熱処理液を、酢酸エチルと 1 : 2 で分配して酢酸エチルに抽出し、減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が 9 : 1 の混合液に溶解した。

次にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル（富士シリシア化学社製、BW-300SP）約 250 cm^3 をクロロホルムとメタノールの比が 9 : 1 の混合液で平衡化させて $\Phi 25\text{ mm} \times 60\text{ cm}$ のカラムに充てんし、上記溶解液を、クロロホルムとメタノールの比が 9 : 1 の混合液で 0.25 Kg f / cm^2 の圧力下クロマトし、約 8 ml ずつ分画した。

適宜フラクションの溶媒を留去して 50 % エタノール水溶液に置換後、実施例 1 記載の MTT 法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。ただし、試料を 50 % エタノール水溶液で 2 倍系列に希釈し、各希釈液 $2\text{ }\mu\text{l}$ 又は 50 % エタノール水溶液 $2\text{ }\mu\text{l}$ を、それぞれ平底 96 ウェルマイクロプレートのウェルに入れた。培養時間は 16 時間とした。

その結果、フラクション 65 ~ 81、又は 177 を添加した培養細胞において、50 % エタノール水溶液を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、フラクション 65 ~ 81、又は 177 添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の 50 % エタノール水溶液 $2\text{ }\mu\text{l}$ 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

【0051】

(3) フラクション 65 ~ 81 について、薄層クロマトグラフィー及び逆相 HPLC 分析を行い、実施例 1 に記載の MTT 法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

薄層クロマトグラフィーは、Silicagel 60F₂₅₄（メルク社製 105554）を用い、クロロホルムとメタノールの比が 9 : 1 の混合液で展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。

逆相 HPLC 分析は、TSK gel ODS-80Ts カラム（ $4.6 \times 250\text{ mm}$ 、東ソー社製）を用い、流速 0.8 ml / 分 、水で 5 分間溶出後 80 % アセトニトリル水溶液へ 20 分間の濃度勾配法で溶出させ、 206 nm における吸

光度で検出した。

上記のフラクション65～81の活性物質は、薄層クロマトグラフィーではR_f値0.42のスポットの物質に、逆相HPLC分析では保持時間8.8分のピークの物質に対応していた。

【0052】

R f 値 0.42 のスポットの物質が検出されたフラクションを集め、溶媒を減圧留去した。

更に、逆相HPLCで活性成分を分取精製した。カラムはTSK gel ODS-80Ts (Φ20×250mm、東ソー社製)を用い、水6.5ml/分で溶出させ、206nmにおける吸光度で検出した。ピーク毎に分取し、減圧濃縮後、上記のMTT法により活性を測定し、活性が認められたピークを重水と重ジメチルスルホキシドに溶解し、核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

その結果を以下に示す。

¹H-NMR

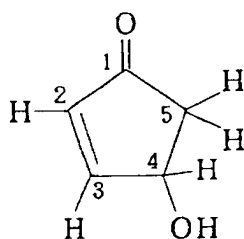
82.38 (1H, dd, J=2.0, 19.0 Hz, 5-H), 2.98 (1H, dd, J=6.5, 19.0 Hz, 5-H), 5.18 (1H, m, 4-H), 6.47 (1H, dd, J=1.5, 6.0 Hz, 2-H), 7.94 (1H, dd, J=2.5, 6.0 Hz, 3-H),

但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして示した。

なお、 $^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルの帰属の番号は下記式（化2）の通りである。

【 0 0 5 3 】

【化2】



【0054】

以上より、本物質は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンであることが明らかになった。

【0055】

(4) フラクシオン177について、実施例4-(3)と同様に、薄層クロマトグラフィー及び逆相HPLC分析を行い、実施例4-(2)に記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

上記のフラクシオン177の活性物質は、薄層クロマトグラフィーではRf値0.37のスポットの物質に、逆相HPLC分析では保持時間16.8分のピークの物質に対応していた。

【0056】

Rf値0.37のスポットの物質が検出されたフラクシオンを集め、溶媒を減圧留去した。

更に、逆相HPLCで活性成分を分取精製した。カラムはTSK gel ODS-80Ts (Φ20×250mm、東ソー社製)を用い、水6.5ml/分で溶出させ、206nmにおける吸光度で検出した。ピーク毎に分取し、減圧濃縮後、上記のMTT法により活性を測定し、活性が認められたピークの質量分析をDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。m-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとして用い、ポジティブイオンモードで測定した。

FAB-MS

m/z 216 [M+H]⁺

更に、核磁気共鳴スペクトルを測定した。核磁気共鳴装置はJNM -A500（日本電子社製）を用いた。その結果を以下に示す。

^1H -NMR

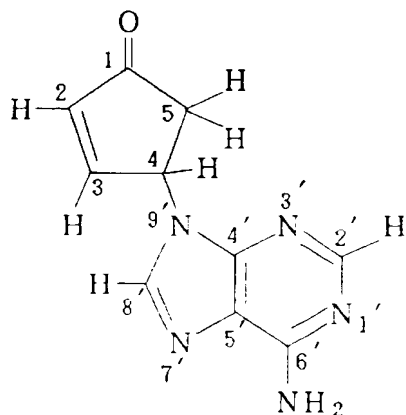
δ 2.71 (1H, dd, $J=3.0, 18.5\text{ Hz}$, 5-H), 2.98 (1H, dd, $J=7.5, 18.5\text{ Hz}$, 5-H), 5.89 (1H, m, 4-H), 6.50 (1H, dd, $J=2.0, 5.5\text{ Hz}$, 2-H), 7.24 (2H, br-S, NH_2 のH), 7.85 (1H, dd, $J=2.5, 5.5\text{ Hz}$, 3-H), 8.10 (1H, S, 2'-H), 8.14 (1H, S, 8'-H)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

なお、 ^1H -NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式（化3）の通りである。

【0057】

【化3】



以上より、本物質は4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン

を意味する名称である。

図1は、本物質の化学構造式を示す。

トルを示す。図中、横軸は m/z 、縦軸は相対強度 (%) を表す。

図2に4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

【0059】

(5) 10W/V% DNA ナトリウム塩水溶液を 121°C で2時間加熱処理した。この加熱処理液を酢酸エチルと1:2で分配し、得られた水相をクロロホルムとメタノールの比が3:1の混合液と1:1で再び分配し、有機溶媒相を減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液を加え、残渣を除去して溶解液を得た。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (富士シリシア化学社製、BW-300SP) 約 250 cm^3 を上記混合液で平衡化させて $\Phi 25\text{ mm} \times 60\text{ cm}$ のカラムに充てんし、上記溶解液を、 0.25 Kg f/cm^2 の圧力下、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で、次いで6:1の混合液でクロマトグラフィーで展開し、約8mlずつ分画した。

各フラクションを、クロロホルムとメタノールの比が4:1の混合液で薄層クロマトグラフィーで展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。フラクション380から500にかけて、赤褐色に呈色する R_f 値0.36のスポットが検出された。

フラクション400~420を集め、有機溶媒を減圧留去後エタノールに置換し、逆相HPLCを行った。

HPLCは、TSK gel ODS-80Tsカラム ($\Phi 20 \times 250\text{ mm}$ 、東ソー社製) を用い、流速 6 ml/分 で8%アセトニトリル水溶液で5分間溶出後40%アセトニトリル水溶液へ30分間の濃度勾配法で溶出させ、 206 nm における吸光度で検出し、溶出時間35分のピークを分取した。

溶出時間35分のピークを、逆相HPLC分析及びHL-60細胞によるMTTアッセイに供した。

逆相HPLC分析は、YMC-Pack ODS-AMカラム ($\Phi 4.6 \times 250\text{ mm}$ 、YMC社製) を用い、流速 0.8 ml/分 で4%から24%アセトニ

トリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、210nmにおける吸光度で検出したところ、溶出時間14分にシングルピークが検出された。

また、MTTアッセイでは、溶出時間35分のピークの乾燥重量約 $13\mu\text{g}/\text{ml}$ でも細胞に変形及びアポトーシス小体形成が認められ、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性が認められた。

【0060】

溶出時間35分のピークを質量分析及び重ジメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

質量分析はDX302質量分析計を用いた。グリセロールをマトリックスとし、ポジティブイオンモードで測定した。

FAB-MS

m/z 232 $[\text{M}+\text{H}]^+$

核磁気共鳴装置はJNM-A50を用いた。試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.49ppmとして表記した。

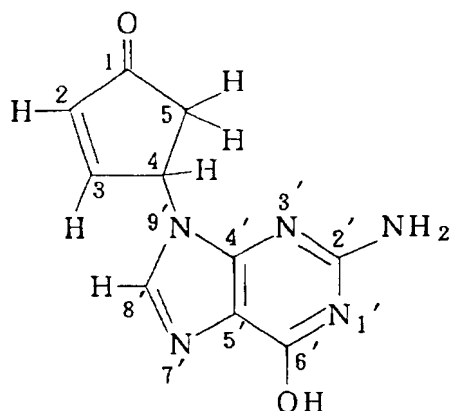
^1H -NMR

σ 2.61 (1H, dd, $J=3.5, 18.5\text{Hz}$, 5-H), 2.91 (1H, dd, $J=7.0, 18.5\text{Hz}$, 5-H), 5.65 (1H, m, 4-H), 6.42 (2H, dd, br-s, 2'-NH₂のH), 6.46 (1H, dd, $J=2.0, 6.0\text{Hz}$, 2-H), 7.65 (1H, s, 8'-H), 7.81 (1H, dd, $J=2.5, 6.0\text{Hz}$, 3-H)

このシグナルの帰属は下記式(化4)の番号の通りである。

【0061】

【化4】



【0062】

以上より、本物質は4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンであることが明らかになった。

図3に4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す。図中、横軸は m/z 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図4に4-(9-グアニニル)-2-シクロペンテン-1-オンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

【0063】

実施例5

(1) 2M D-リボース(ナカライテスク社製、302-10)水溶液を121℃で4時間加熱処理した。この加熱処理液を減圧濃縮後酢酸エチルと1:2で分配して酢酸エチルに抽出し、酢酸エチルを減圧留去後、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液に溶解した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル(富士シリシア化学社製、BW-300SP)約250 cm^3 をクロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で平衡化させて $\Phi 25\text{mm} \times 60\text{cm}$ のカラムに充填し、上記溶解液を、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で0.2 Kg f/cm^2 の圧力下クロマトグラフィーで展開し、約8mlずつ分画した。適宜フラクションの溶媒を留去し

て50%エタノール水溶液に置換後、実施例4-(2)記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。

その結果、フラクション 28～36 を添加した培養細胞において、50% エタノール水溶液を添加したものに比べ著しく生細胞数が減少した。また、光学顕微鏡観察において、フラクション 28～36 添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の 50% エタノール水溶液 2 μ l 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

【 0 0 6 4 】

(2) フラクション28～36について、実施例4-(3)と同様に、薄層クロマトグラフィー及び逆相HPLC分析を行い、実施例4-(2)に記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス小体形成を測定した結果、がん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発活性が認められた。

上記のフラクション28～36の活性物質は、薄層クロマトグラフィーではR_f値0.44のスポットの物質に、逆相HPLC分析では保持時間9.7分のピークの物質に対応していた。

Rf 値 0.44 のスポットが主に検出されたフラクション 28～36 を集め、減圧濃縮し、逆相 HPLC で分析したところ、保持時間 9.7 分のシングル・ピークが検出された。

この画分の質量分析をDX302質量分析計を用いて行った。チオグリセロールをマトリックスとして用い、ポジティブイオンモードで測定した。

F A B - M S

m/z	115	[M+H] ⁺
	97	[M-H ₂ O+H] ⁺
	79	[M-2H ₂ O+H] ⁺

[illegible]

を用いた。その結果を以下に示す。

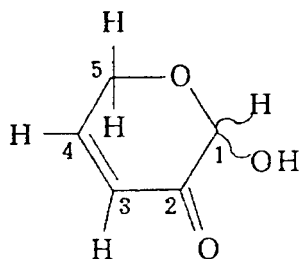
4. 51 (1H, td, $J=2.5, 19.5$ Hz, 5-H), 4. 93 (1H, d, $J=6.0$ Hz, 1-H), 6. 02 (1H, m, 3-H), 7. 23 (1H, ddd, $J=2.5, 4.0, 10.0$ Hz, 4-H), 7. 26 (1H, d, $J=6.0$ Hz, 1-OHのH)

但し、試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2. 49 ppmとして表した。

^1H -NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式(化5)の通りである。

【0066】

【化5】



【0067】

以上より、本物質は1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンである事が明らかになった。

図5に1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンのマススペクトルを示す。図中、横軸は m/z 、縦軸は相対強度(%)を表す。

図6に1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンの ^1H -NMRスペクトルを示す。図中、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を表す。

【0068】

実施例6

(1) 2M 2-デオキシ-D-リボース(シグマ社製、D2851)水溶液を121℃で4時間加熱処理した。この加熱処理液5mlを減圧乾固後、クロロホルムとメタノールの比が98:2の混合液に溶解した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（富士シリシア化学社製、BW-300SP）約 250 cm^3 を上記混合液で平衡化させて $\Phi 25\text{ mm} \times 60\text{ cm}$ のカラムに充てんし、上記溶解液を、クロロホルムとメタノールの比が98:2の混合液で 0.2 Kg f/cm^2 の圧力下クロマトし、約 8 ml ずつ分画した。

各フラクションの溶媒を留去して50%エタノール水溶液に置換後、薄層クロマトグラフィー、逆相HPLC分析及びヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞によるMTTアッセイに供した。

薄層クロマトグラフィーは、Silicagel 60F₂₅₄（メルク社製1.05554）を用い、クロロホルムとメタノールの比が9:1の混合液で展開し、オルシノール硫酸呈色試液で検出した。逆相HPLC分析は、TSK gel ODS-80Tsカラム（ $4.6 \times 250\text{ mm}$ 、東ソー社製）を用い、流速 0.8 ml/分 、水で5分間溶出後80%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、 206 nm における吸光度で検出した。

MTTアッセイは実施例4-(2)に記載の方法で行った。

MTTアッセイにより、フラクション48及び88に強い細胞増殖阻害活性が認められた。フラクション48は、薄層クロマトグラフィーではRf値0.52のスポットが、逆相HPLC分析では保持時間9.1分のピークが検出された。フラクション88は、薄層クロマトグラフィーではRf値0.35のスポットが、逆相HPLC分析では保持時間9.1分のピークが検出された。

これらのフラクションを質量分析及び重ジメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析したところ、フラクション48は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、フラクション88はトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールであった。

【0069】

（実施例5）
フラクション48の溶解液を 100 ml の容量瓶に定容し、 100 ml の容量瓶に静置保存する、白色の固形物が生じた。

（実施例6）
フラクション88の溶解液を 100 ml の容量瓶に定容し、 100 ml の容量瓶に静置保存する、白色の固形物が生じた。

エタノール溶液はシリカカラムで再クロマトグラフィーで展開した。すなわちカラムクロマトグラフィー用シリカゲル（富士シリシア化学社製、BW-300SP）約 250 cm^3 をクロロホルム：メタノール=98：2の混合液で平衡化後、 0.2 Kg f/cm^2 の圧力下、同混合液でクロマトし、約 8 ml ずつ分画した。

フラクション90から126にトランス-4、5-ジヒドロキシー-2-ペンテナールが溶出し、フラクション67から76にサブ物質が溶出した。

上記の固形物及びサブ物質を逆相HPLC分析及びHL-60細胞によるMTTアッセイに供した。

逆相HPLC分析は、YMC-Pack ODS-AMカラム（ $\Phi 4.6 \times 250\text{ mm}$ 、YMC社製）を用い、流速 0.8 ml/分 で水で5分間溶出後80%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、 210 nm における吸光度で検出した。

固形物では溶出時間18分にシングルピークが、サブ物質では溶出時間18分にメインピークが検出された。

また、MTTアッセイでは、固形物、サブ物質ともに細胞に変形及びアポトーシス小体形成が認められ、細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘導活性がそれぞれ認められた。

【0070】

固形物を質量分析及び重ジメチルスルホキシドに溶解した核磁気共鳴スペクトルにより分析した。

質量分析はDX302質量分析計を用いた。グリセロールをマトリックスとし、ポジティブイオンモードで測定した。

FAB-MS

m/z 215 $[M+H]^+$
 237 $[M+Na]^+$

核磁気共鳴装置はJNM-A50を用いた。試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を 2.49 ppm として表記した。

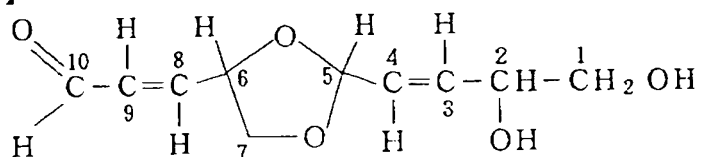
$^1\text{H-NMR}$

σ 3.30 (2H, m, 1-H), 3.80 (1H, dd, $J=5.0, 8.5\text{ Hz}$, 7-H), 4.01 (1H, m, 2-H), 4.05 (1H, t, $J=8.5\text{ Hz}$, 7-H), 4.66 (1H, t, $J=6.0\text{ Hz}$, 1-OHのH), 4.84 (1H, m, 6-H), 4.96 (1H, d, $J=5.0\text{ Hz}$, 2-OHのH), 5.31 (1H, d, $J=6.5\text{ Hz}$, 5-H), 5.66 (1H, ddd, $J=1.5, 6.5, 15.5\text{ Hz}$, 4-H), 6.01 (1H, d, $J=4.5, 15.5\text{ Hz}$, 3-H), 6.21 (1H, ddd, $J=1.5, 8.0, 15.5\text{ Hz}$, 9-H), 7.03 (1H, dd, $J=5.5, 15.5\text{ Hz}$, 8-H), 9.57 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, 10-H)

このシグナルの帰属は下記式(化6)の番号の通りである。

【0071】

【化6】



【0072】

以上より、本物質は2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランであることが明らかになった。

図7に2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランの化学構造式を示す。

図7、横軸は化学シフト、縦軸は相対強度

表1

図8は2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランの化学構造式を示す。

図9に2-(トランス-3,4-ジヒドロキシー1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサランの化学構造式を示す。

【0073】

(3) 実施例 6-(1) 記載の加熱処理物の濃縮物を調整し、この濃縮物のシリカクロマトを行った。すなわちカラムクロマトグラフィー用シリカゲル（富士シリシア化学社製、BW-300SP）約 250 cm^3 をクロロホルム：メタノール=98：2の混合液で平衡化後、 0.2 Kg f/cm^2 の圧力下、同混合液でクロマトグラフィーで展開し、約 8 ml ずつ分画した。

フラクション 67~76 を分取、濃縮した後、YMC-Pack ODS-A Mカラム（ $\Phi 4.6 \times 250\text{ mm}$ 、YMC社製）を用い、流速 0.8 ml/分 で水で5分間溶出後80%アセトニトリル水溶液へ20分間の濃度勾配法で溶出させ、 210 nm における吸光度で検出し、溶出時間18分のシングルピークを分取し、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキソランを得た。

【0074】

実施例 7

(1) 56°C 、30分間処理した牛胎児血清（JRH社製）を10%含むRPMI 1640培地（バイオウイタッカー社製）にて 37°C で培養したHL-60（ATCC CCL-240）をRPMI 1640培地にて 2.5×10^5 コ/ 5 ml となるように懸濁した。

この懸濁液 5 ml に対し、実施例 6-(1) で調製した4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールの12.5 mM、25 mM、50 mM、100 mM 70%エタノール水溶液、実施例 6-(1) で調製した4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの0.05 mM、0.5 mM、5 mM、50 mM 70%エタノール水溶液を $10\text{ }\mu\text{l}$ 添加し、 37°C 、5%二酸化炭素存在下で、24時間培養した。

培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、最終濃度 $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上の4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、最終濃度 $10\text{ }\mu\text{M}$ 以上の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の70%エタノール溶液 10 ml 添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

【0075】

(2) 56℃、30分間処理した牛胎児血清を10%含むRPMI 1640培地にて37℃で培養したHL-60をRPMI 1640培地にて 2.5×10^5 コ/5mlとなるように懸濁した。

この懸濁液5mlに対し、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールの12.5mM、25mM、50mM、100mM 70%エタノール水溶液、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの0.05mM、0.5mM、5mM、50mM 70%エタノール水溶液、実施例4-(4)で調製した4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの2.5mM、5mM、15mM、25mM 70%エタノール水溶液を10 μ l添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で、24時間と48時間培養した細胞を用い、1994年秀潤社発行、細胞工学別冊実験プロトコルシリーズアポトーシス実験プロトコル、第129~130頁に記載の方法でFACS canを用いたアポトーシス細胞の測定、1995年羊土社発行、バイオマニュアルUPシリーズ 最新アポトーシス実験法、第61~63頁に記載の方法でDNAの断片化の解析を行った。

その結果、最終濃度50 μ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、最終濃度10 μ M以上の4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度30 μ M以上の4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン添加培養細胞にアポトーシス細胞を確認した。また50、100、200 μ M 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、10 μ Mの4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、最終濃度10、30 μ Mの4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン添加培養細胞にDNAの断片化を確認した。なお対照の70%エタノール溶液10 μ l添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

細胞をトリパンブルーで染色し、0.4%トリパンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察し、染色されて死んだ細胞は赤く、生きた細胞は青く染色される。この結果を、表1に示す。

【0077】

【表1】

表1

物質名	生残率 ₅₀ (μM)
4, 5-ジヒドロキシ- 2-ペンテナール	124
4-ヒドロキシ-2-シ クロペンテン-1-オン	25.5
4-(9-アデニル)-2 -シクロペンテン-1-オン	21.7

【0078】

実施例8

(1) トポイソメラーゼII〔トポジェン社製、2単位/μl〕2μl、10倍濃度緩衝液〔0.5M Tris-HCl (pH8.0)、1.2M KCl、0.1M MgCl₂、5mM アデノシン三リン酸、5mMジチオスレイトール〕2μl、0.1%ウシ血清アルブミン（宝酒造社製）2μl、蒸留水11μl及び対照の蒸留水又は水で様々な濃度に調製した4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン2μlを混合したものに、0.25μg/μl pBR322 DNA（宝酒造社製）1μlを添加して37℃で反応させた。30分間反応後、1%ドデシル硫酸ナトリウム、50%グリセロール、0.02%ブロモフェノールブルー水溶液2μlを添加して反応を停止した。

アガロースL03（宝酒造社製）とTAE緩衝液〔40mM Tris、5mM酢酸ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）二ナトリウム、

酢酸で pH 7.8 に調整] を用いて作製した 1 % アガロースゲルに上記反応液 20 μ l をアプライし、TAE 緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 1 μ g / ml エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射して DNA 電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照では DNA が超らせん型から弛緩型に完全に変化するが、トポイソメラーゼ II 活性が阻害されると超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果、水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に変化した。100 μ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンによってDNAの超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、各化合物のトポイソメラーゼII阻害活性が確認された。

【 0 0 7 9 】

(2) 実施例 8 - (1) と同様の方法で各化合物のトポイソメラーゼ I 阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼ II の代りにトポイソメラーゼ I [トポジェン社製、0.01 単位/μl]、10 倍濃度緩衝液として 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM EDTA 二ナトリウム、1 mM スペルミン、50% グリセロールを用いた。

その結果、各化合物にトポイソメラーゼ I 阻害活性は確認できなかった。

以上、正常細胞では分裂期のみに一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼIIに対し各化合物は特異的な阻害活性を示した。

【 0 0 8 0 】

实施例 9

ヒト細胞株であるHs 68細胞(ATCC CRL-1635)を10%ウシ

養し、トリプシン-E D T A 溶液（バイオウイタッカー社製）で細胞を 3×10^5 個に分散し、100%胎児牛血清（FBS）の含有した培養液（DMEM/F12）に細胞を接種し、細胞の増殖を待たせ、細胞が confluent になるまで培養した。細胞の増殖を待たせ、細胞が confluent になるまで培養した。

った時点で培地を捨て、5、10、20、40、100又は200 μ M 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを含有する培地を加えた。96時間のタイムコースを取って、24時間ずつ経時的に培養上清を回収し、Hs68細胞におけるhIGF-1産生誘導に対する4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの影響をhIGF-1のELISA-キット（ダイアグノスティックス システム ラボ 社製）を用いて測定した。

その結果、Hs68細胞において、100 μ M以上の4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、又は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを添加した場合には、hIGF産生誘導活性は24時間目に最大となり、それから経時的に減少した。なお、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと比較して4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンのhIGF-1誘導活性が強かった。

その結果を表2と表3に示す。

【0081】

【表2】

表2

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度 (μ M)	hIGF-1産生誘導活性 (ng/ml)			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	39.9	10.0	9.6	4.4
200	37.9	10.4	9.9	4.2

【0082】

【表3】

表3

4, 5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
hIGF-1 産生誘導活性				
濃度 (μ M)	(ng/ml)			
0	0	0	0	0
40	0	0	0	0
100	15.3	10.0	5.2	4.6
200	11.3	11.1	9.9	4.5

【0083】

以上、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンはhIGF-1 産生誘導活性を示した。

【0084】

実施例10

(1) 組織性リンパ腫患者の胸水から樹立された滑膜細胞株であるU937細胞(ATCC CRL-1593)を10%FBSを含有するRPMI1640培地に 5×10^5 個/mlとなるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートに100 μ l ずつ分注した。更に、上記の培地を100 μ l 加え、

に加えた。これを37℃炭酸ガス存在下で培養し、24, 48, 72時間後、1

【0085】

時間後、100 μ l ずつ分注した。更に、上記の培地を100 μ l 加え、

ける吸光度 (A₆₅₀) を差し引いた値を細胞増殖度とした。

その結果を表 4 と表 5 に示す。

【0085】

【表 4】

表 4

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間		
	24 時間	48 時間	72 時間
濃度 (μM)	細胞増殖度 (A ₄₅₀₋₆₅₀)		
0	0.940	3.912	1.829
50	0.501	0.930	0.875
75	0.557	0.968	0.821
100	0.591	1.054	0.532
150	0.524	1.126	0.478
200	0.353	0.643	0.338

【0086】

【表 5】

表5

4, 5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 (μM)	細胞増殖度 ($A_{450-650}$)		
0	0.940	3.912	1.829
50	0.821	1.471	1.245
75	0.606	0.879	0.862
100	0.560	0.948	0.597
150	0.505	0.823	0.465
200	0.370	0.644	0.753

【0087】

以上、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンは滑膜細胞への増殖抑制活性を示した。

【0088】

(2) ヒト慢性リウマチ患者の滑膜から樹立された繊維芽細胞株であるDSEK細胞 (in vitro のリウマチモデルとして、埼玉医科大学総合医療センター第二内科保有) を10%FBS (バイオウイタッカー社製) を含むIscoV-MEM培地 (IMDM: ギブコBRL社製) にて、5%CO₂ 存在下、37℃で細胞が培養器に飽和になるまで培養し、トリプシン-EDTA溶液 (バイオウイ

タッカー社製) を用いて細胞を消化し、細胞懸濁液を100μlずつ分注した。培養5~7日後、ほぼ細胞が80%飽和になった時で培地を交換し、新しい培地 (IscoV-MEM培地) にて細胞を培養した。細胞が再び80%飽和になった時で培地を交換し、新しい培地 (IscoV-MEM培地) にて細胞を培養した。細胞が再び80%飽和になった時で培地を交換し、新しい培地 (IscoV-MEM培地) にて細胞を培養した。

上記培地を加えた。

96時間のタイム コースを取って、24時間ずつ経時的に10 μ lのプレミックスWST-1（宝酒造社製、MK400）を加えて37℃で3.5時間反応させ、450nmにおける吸光度（ A_{450} ）から650nmにおける吸光度（ A_{650} ）を差し引いた値を細胞増殖度とした。

その結果を表6と表7に示す。

また $A_{450} - A_{650}$ のデータによって求められた半数細胞増殖抑制濃度-IC₅₀を表8に示す。

【0089】

【表6】

表6

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
濃度（ μ M）	細胞増殖度 （ $A_{450-650}$ ）			
0	1.04	1.25	1.46	2.35
50	0.57	0.71	0.73	0.54
75	0.51	0.68	0.68	0.55
100	0.50	0.64	0.67	0.51
150	0.46	0.55	0.63	0.50

【0090】

【表7】

表 7

濃度 (μM)	培養時間			
	24時間	48時間	72時間	96時間
0	1.04	1.25	1.46	2.33
50	1.12	0.83	0.96	0.98
75	1.11	0.77	0.67	0.59
100	1.02	0.63	0.54	0.59
150	0.96	0.61	0.41	0.55

【 0 0 9 1 】

【表 8】

表 8

I C ₅₀	4-ヒドロキシ-2-	4, 5-ジヒドロキシ-2-
	シクロペンテン-1-	ペンテナール
	オン	
	4 8 時間	9 6 時間
	4 8 時間	9 6 時間

【 0 0 9 2 】

ーペンテナールを添加した場合、PBS添加の対照区と比べて両方ともリウマチ細胞の増殖が強く抑制された。また、経時的な観察において、両物質は増殖抑制活性を継続するのみならず、経時的に活性を増強する傾向が認められた。

以上の結果によって、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールは強い抗リウマチ活性があり、慢性リウマチに対する有用な治療薬と健康食品として開発されることが期待される。

また、DSEK細胞培養において、24時間ずつ経時的に150 μ l/ウエルの培養上清を回収し、この細胞由来のサイトカン（ヒトTGF- β 、ヒトFGF- β 及びヒトIL-10）産生（発現の影響）に対する、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールの影響を、それぞれのサイトカインに特異的なELISA-Kit（ヒトFGF- β とヒトIL-10、INTERGEN社製；ヒトTGF- β 、Promega社製）を用いて測定した。その結果は4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールはヒトTGF- β 産生抑制活性及びヒトIL-10産生抑制活性を示し、ヒトFGF- β 産生には影響を与えなかった。

【0093】

実施例11

原発性肝芽細胞腫ヘパトблаストマ患者から樹立された細胞株であるHep G2細胞（ATCC HB-8065）を10%FBS（バイオウイタッカー社製）を含有するDMEM培地（ギブコ社製）に 3.8×10^3 個/mlとなるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに200 μ lずつ分注し、細胞が培養器に飽和になるまで37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス存在下で培養し、培地を交換した後、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、又は4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールを25、50、100又は150 μ M含有するように加え、24、48、72時間培養後、10 μ lのプレミックスWST-1（宝酒造社製、MK400）を加えて、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させ、450nmにおける吸光度（ A_{450} ）から650nmにおける吸光度（ A_{650} ）を差引いた値を細胞増殖度とした。

その結果を表9と表10に示す。

【0094】

【表9】

表9

4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1- オン	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 (μM)	細胞増殖度 ($A_{450-650}$)		
0	3.47	2.96	2.57
25	1.30	0.70	0.49
50	1.38	0.81	0.47
100	1.31	0.56	0.35
150	1.23	0.43	0.30

【0095】

【表10】

表10

4, 5-ジヒドロキシ -2-ペンテナール	培養時間		
	24時間	48時間	72時間
濃度 (μM)	細胞増殖度 ($A_{450-650}$)		
0	3.47	2.96	2.57
25	3.39	2.69	1.70
50	1.97	2.96	1.70
100	1.81	2.70	0.89
150	1.40	0.79	0.35

【0096】

以上、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールはヒトヘパトブラストーマHepG2細胞に対し、がん細胞増殖抑制活性を示した。

【0097】

実施例12

(1) 2×10^5 細胞/mlのHL-60(ATCC CCL-240)を含む10%FBS含有RPMI1640培地5mlを6穴プレートの各ウェルに入れ、37℃、5%CO₂存在下で24時間培養した後、最終濃度が、0、12.5、25、50、100 μM になるように4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールを、最終濃度が、0、2.5、5、10、20、40、80 μM になるように4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを添加し、更に6時間培養を続けた。

培養終了後、細胞数を計測した後、細胞を遠心分離で回収し、PBSで洗浄して、各試料処理細胞を調製した。また、45℃、5分間熱処理を行った後、同様

に培養した細胞も調製した。

これらの処理細胞を用い、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) [コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989)] 記載の方法に従ってSDS-PAGEを行った。処理細胞は、 2.5×10^6 細胞/mlになるようにSDS-PAGE Sample bufferに懸濁し、この細胞懸濁液を100℃で10分間処理した後、5 μ lずつを2枚のSDS-PAGEゲル(5%スタッキングゲル、10%セパレーションゲル)にアプライし、電気泳動を行った。一方のゲルは、クマシー染色し、他方のゲルは、Polyvinylidene difluoride transfer membrane [ImmobilonTM: ミリポア (MILLIPORE) 社製 Cat.# IPVH000-10] にブロッティングした。このメンブレンをBlock Ace (大日本製薬株式会社 Cat.# UK-B25) で4℃一晩ブロッキングした。

このブロッキングしたメンブレンに熱誘導される70kDa の熱ショックタンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体HSP 72/73(Ab-1) [オンコジーン リサーチ プロダクツ (Oncogene Research Products) 社製 Cat.# HSP01] を反応させた後、0.05% Tween20 を含むTBSで洗浄し、更に、TBSで洗浄した。次いで、Peroxidase複合二次抗体HRP-RabbitAnti Mouse IgG (H+L) [ZYMED ラボラトリース社 (ZYMED Laboratories, Inc.) 製 Cat.# 61-6520] を反応させ、先の操作と同様に洗浄した。このように一次抗体、二次抗体と反応させたメンブレンに、ケミルミノール試薬 RENAISSANCETM [デュポン NEN (Dupont NEN) 社製 Cat.# NEL-100] を反応させた後、X-Ray フィルムを感光して70kDa の熱ショックタンパクの誘導を確認した。

その結果、4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、及び4-ヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オンの熱ショックタンパクの誘導が確認された。その誘導の強弱は表11と表12に示した。なお表11、表12中、+は誘導の強さ

【0098】

表 1 1

	濃度 (μ M)			
	1. 2 5	2 5	5 0	1 0 0
4, 5-ジヒドロキシ- 2-ペンテナール	-	±	+++	-

【0099】

【表 1 2】

表 1 2

	濃度 (μ M)					
	2. 5	5	1 0	2 0	4 0	8 0
4-ヒドロキシ-2- シクロペンテン-1-オン	-	±	+	+++	++	±

【0100】

ただし、未処理のコントロールは、-、熱処理 45℃、5 分間熱処理は、++ であった。

【0101】

実施例 13 注射剤

実施例 1 記載の D-リボースの加熱処理物の中和物の濃縮乾固物を注射用蒸留水に溶解し、1%溶液を調製した。この溶液を凍結乾燥用バイアル瓶 1 バイアル中に、上清画分の乾燥物換算で 10 mg 充てんし、凍結乾燥を行った。別に溶解液として生理食塩水 2 ml を添加した。

同様に実施例 2 記載の 2-デオキシ-D-リボースの加熱処理物を用い注射剤を調製した。

同様に 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを用い注射剤を調製した。

【0102】

実施例 14 錠剤

下記処方に従い錠剤を調製した。

DNAナトリウム塩加熱処理物	10mg
コーンスターチ	65mg
カルボキシメチルセルロース	20mg
ポリビニルピロリドン	3mg
ステアリン酸マグネシウム	2mg
1錠当たり	計 100mg

実施例 4 記載の DNA ナトリウム塩加熱処理物の凍結乾燥物を使用した。

同様に 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを用い錠剤を調製した。

【0103】

【発明の効果】

本発明は、ヒトの胎児の発育を促進する作用を有する DNA ナトリウム塩加熱処理物、及びアボト-シス誘発用物質である 4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサラン又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを用いた錠剤、注射剤、及びその調製法に関する。

クロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン又は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンが提供される。がん性疾患、とりわけ大腸がん、胃がん等消化器系のがんの場合、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物及び／又はアポトーシス誘発用物質を食品、飲料として経口的に摂取することによりがん細胞にアポトーシスを起こさせることができ、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物及び／又はアポトーシス誘発用物質を含有、添加及び／又は希釈した食品又は飲料は消化器系がんの治療、予防に優れた効果を有している。本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物及び／又はアポトーシス誘発用物質を有効成分として含有する薬剤はがん細胞、滑膜細胞等の異常増殖細胞に増殖抑制活性を有し、生体の恒常性の維持に極めて有用である。またhIGF産生誘導能より、hIGF産生誘導を要する疾患の治療、予防において有用である。更に熱ショックタンパク誘導能により、熱ショックタンパク誘導を要する疾患、例えばウイルス制疾患の治療、予防に有用である。

【0104】

本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物及び／又はアポトーシス誘発用物質は食品を原料として安価に大量に供給可能である。また、本発明のアポトーシス誘発用加熱処理物及び／又はアポトーシス誘発用物質を有効成分として使用することにより、簡便なアポトーシス誘発方法が提供され、該方法を使用することによりアポトーシス機構の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等を行うことができる。

また本発明においてアポトーシス誘発作用を有する4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3,4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1,3-ジオキサラン及び／又は1,5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを有効成分とする医薬が提供され、該医薬はがん疾患、リウマチ、糖尿病、ウイルス病等の難治性の疾患の治療、予防に極めて有用である。

また本発明においてアポトーシス誘発作用を有する 4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソラン及び／又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料が提供され、該食品又は飲料はがん疾患、リウマチ、糖尿病、ウイルス病等の難治性の疾患の予防や症状改善に有用なアポトーシス誘発用、制がん用、抗リウマチ用、抗糖尿病用、熱ショックタンパク誘導用の機能性食品又は飲料である。

更に本発明により、4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、4-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンの簡便な製造方法が提供される。また、生理活性を有する新規化合物、4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オン、4-(9-グアニル)-2-シクロペンテン-1-オン、2-(3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキソラン及び／又は 1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンのマススペクトルを示す図である。

【図 2】

4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す図である。

示す図である。

【図 3】

4-(9-アデニル)-2-シクロペンテン-1-オンの $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを示す図である。

クトルを示す図である。

【図5】

1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンのマススペクトルを示す図である。

【図6】

1, 5-エポキシ-1-ヒドロキシ-3-ペンテン-2-オンの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【図7】

2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサランのマススペクトルを示す図である。

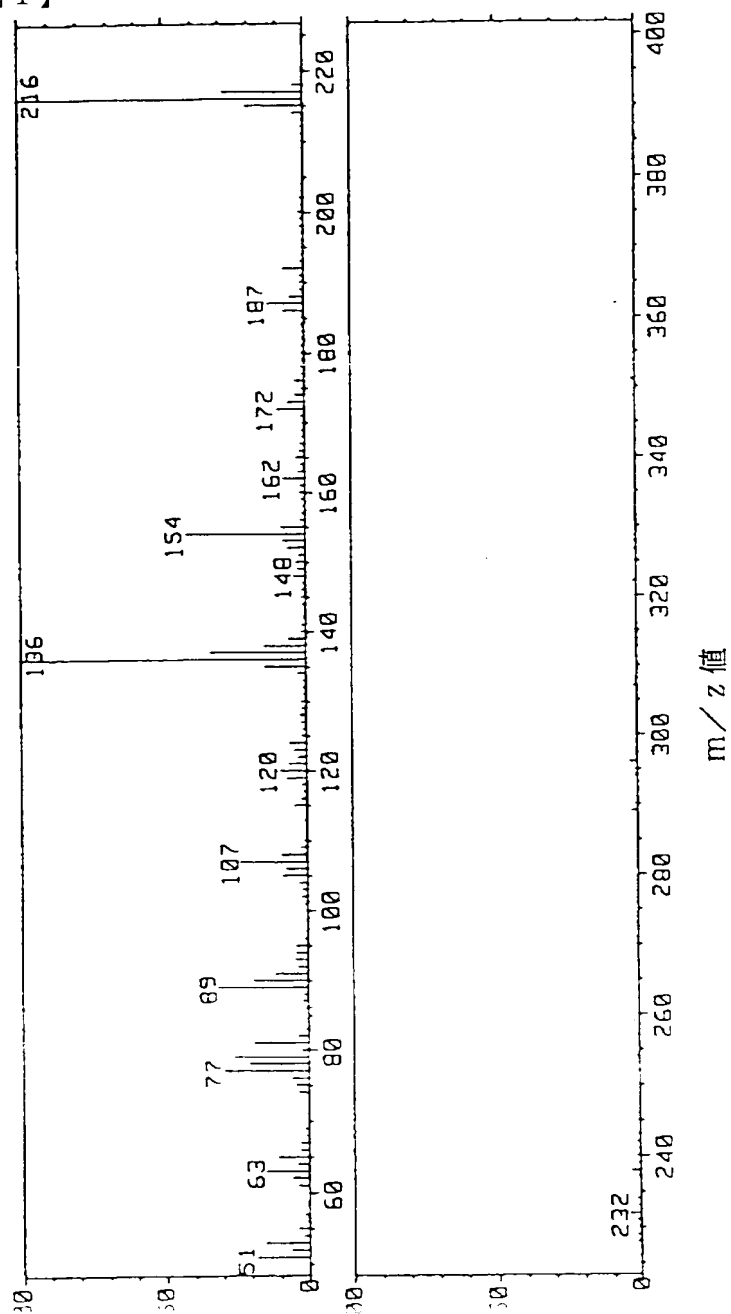
【図8】

2-(トランス-3, 4-ジヒドロキシ-1-ブテニル)-4-(トランス-2-ホルミルビニル)-1, 3-ジオキサランの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【書類名】 図面

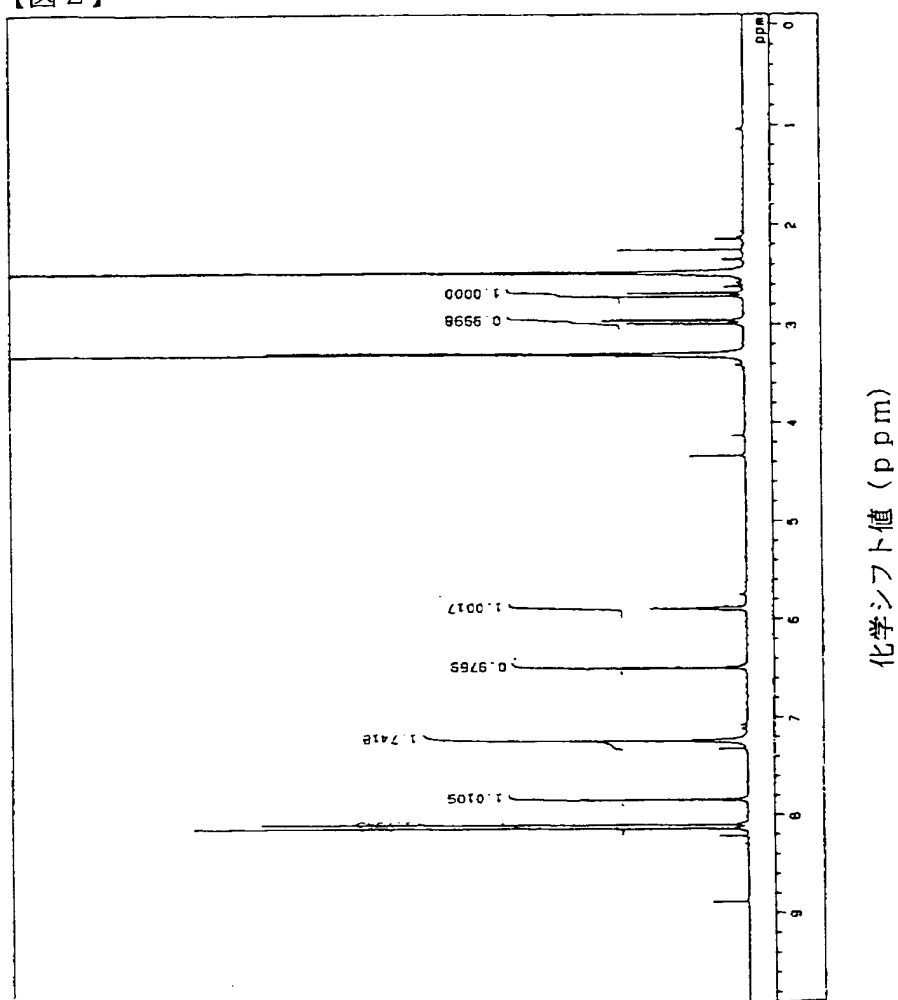
1 / 8

【図 1】



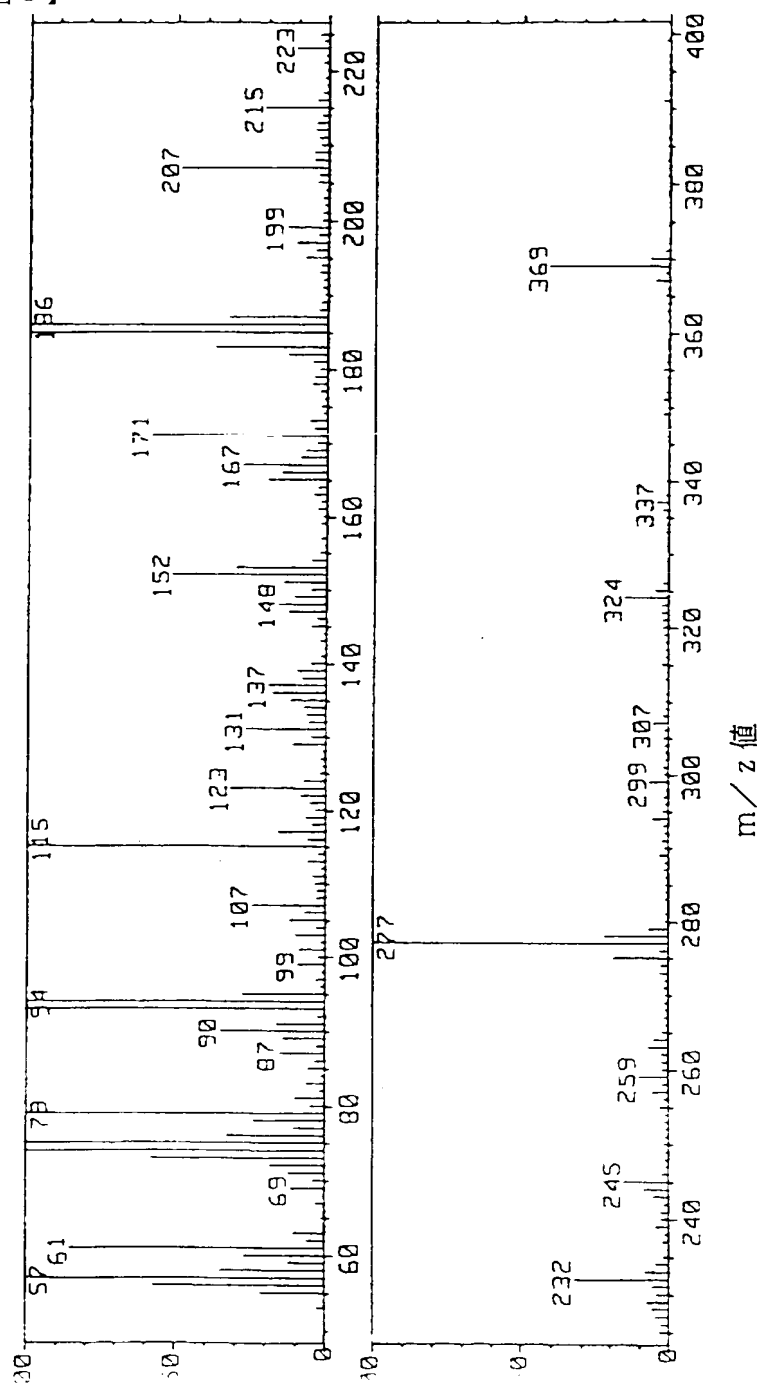
【図 2】

2 / 8



シグナルの強度

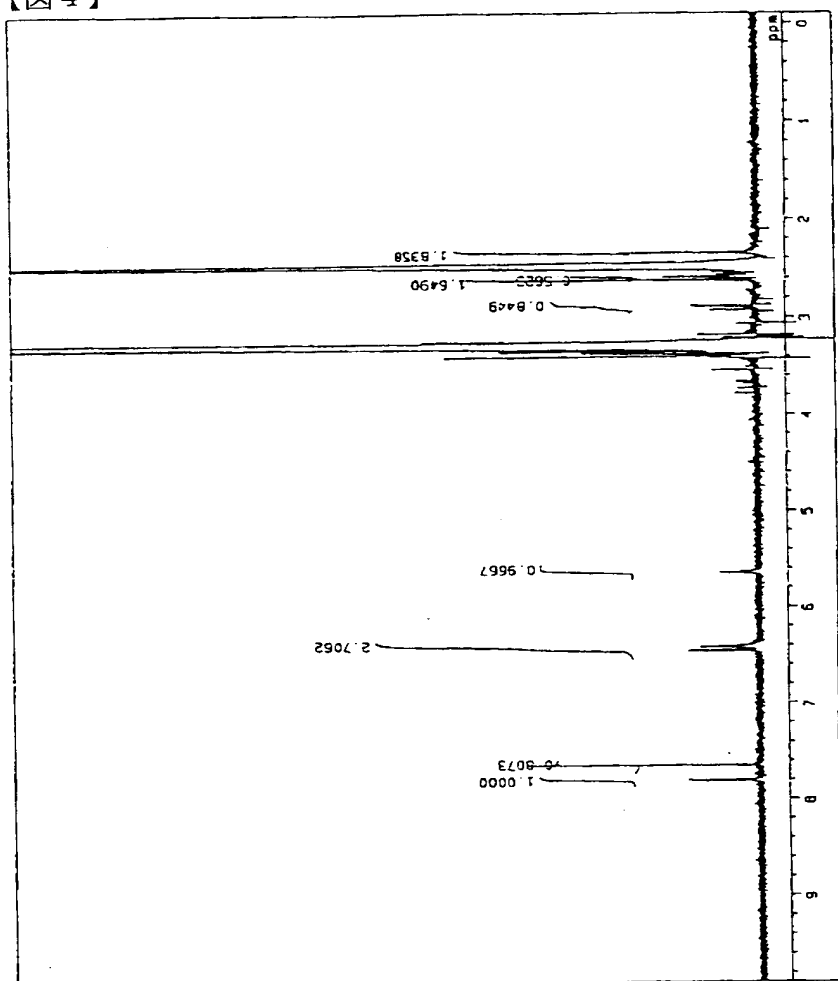
【图 3】



特平 10-288701

4 / 8

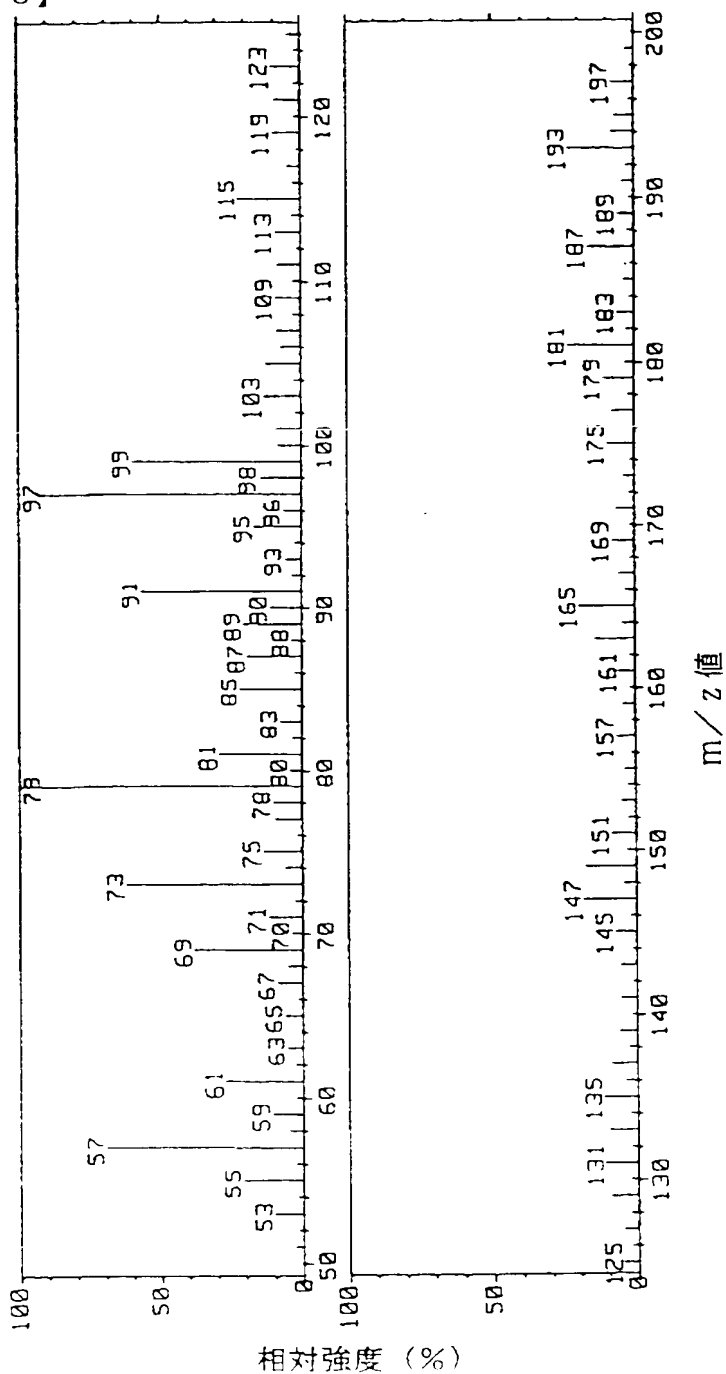
【図 4】



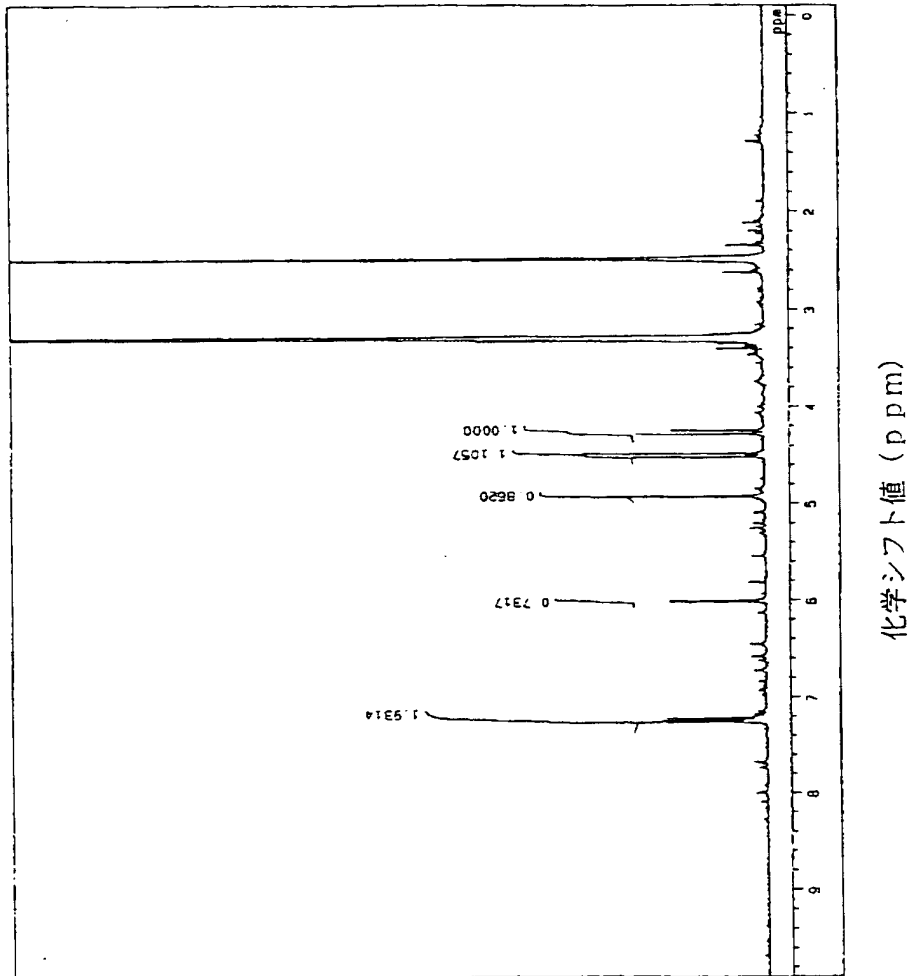
化学シフト値 (ppm)

シグナルの強度

【图 5】

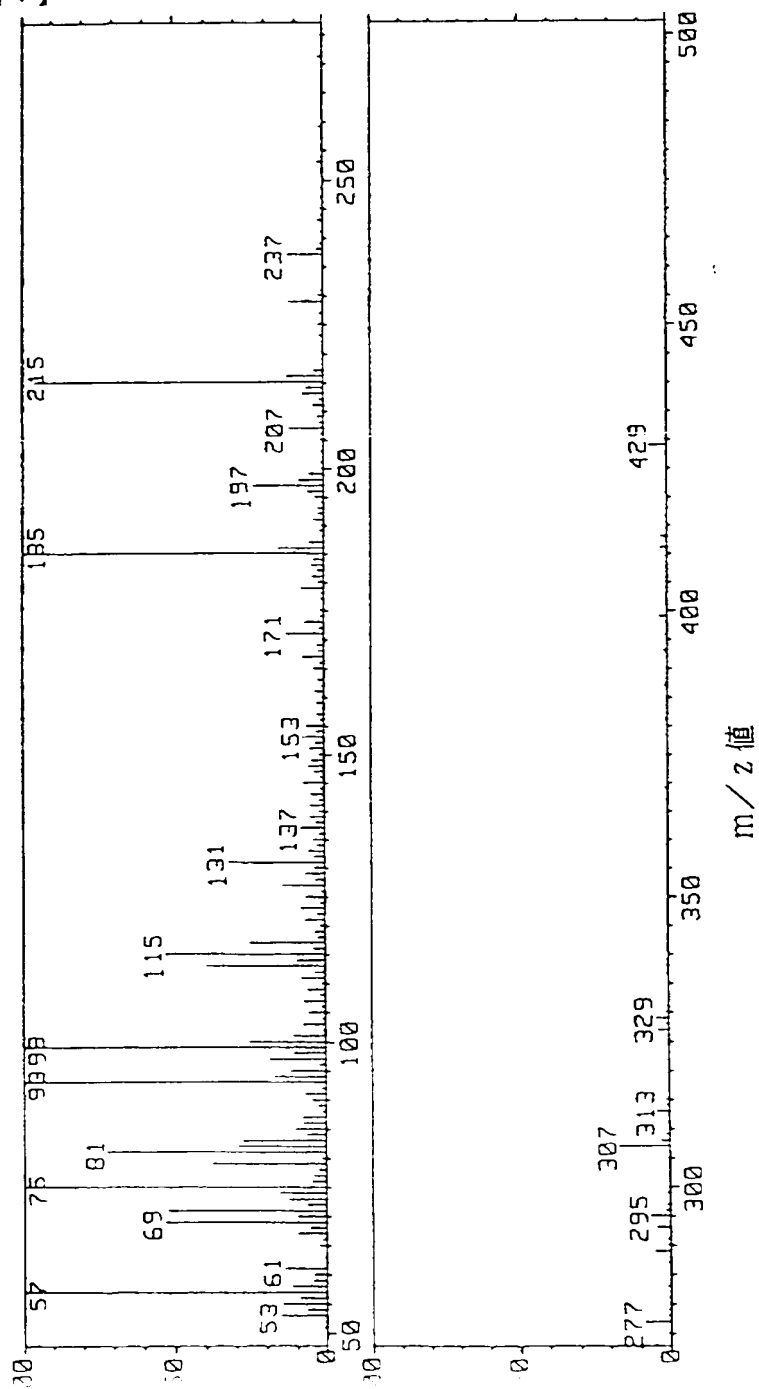


【図 6】

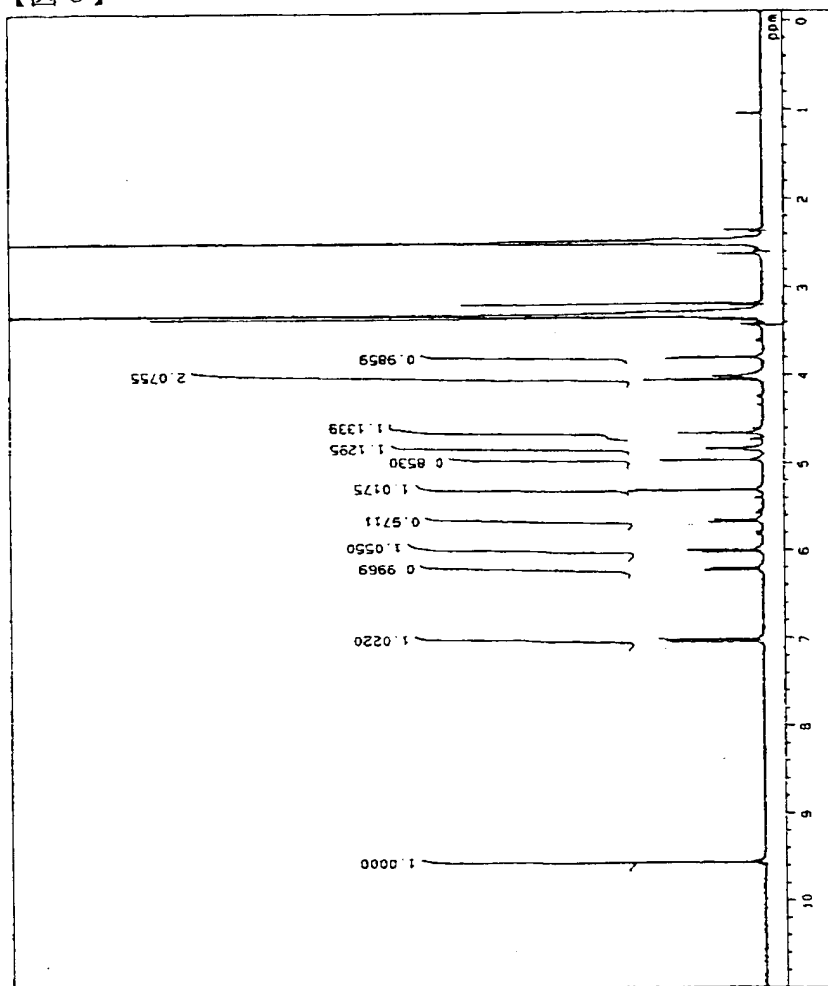


シグナルの強度

【図 7】



【図 8】



化学シフト値 (ppm)

シグナルの強度

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、その製造方法及び該アポトーシス誘発用物質を有効成分とする医薬、飲食品を提供する。

【解決手段】 ペントース若しくはその誘導体、又はそれらを含む化合物（ウロン酸関連化合物を除く）を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質。該加熱処理工程を含む該物質の製造方法。4，5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール、又はその関連化合物を有効成分とする医薬、あるいはそれを含む、希釈及び／又は添加してなる飲食品又は飲料。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

591038141

【住所又は居所】

京都府京都市伏見区竹中町609番地

【氏名又は名称】

寶酒造株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100078503

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】

中本 宏

【代理人】

申請人

【識別番号】

100087022

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】

井上 昭

【代理人】

申請人

【識別番号】

100089428

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】

吉嶺 桂

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社

